



外因性NOによるバレット食道発生に対する影響について

著者	遠藤 博之
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/48138

博士論文

外因性 NO によるバレット食道発生に対する影響について

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座消化器病態学分野

遠藤博之

要約

研究背景

バレット食道は食道・胃接合部癌の発生母地と考えられ、その成因として胃酸や胆汁酸の食道内への逆流との関連が検討されているが、未だ十分な解明はなされていない。ヒトが硝酸塩を多く含む食物を摂取すると、硝酸塩の唾液～腸管再循環（entro-salivary re-circulation of dietary nitrate）により食後数時間にわたり唾液中に高濃度の亜硝酸塩が存在し、それらは嚥下された後、食道・胃接合部内腔でアスコルビン酸を含む強酸性の胃液と反応し、速やかに一酸化窒素（NO）へと変換される。胃酸が食道へ逆流する場合、NO の発生部位は食道・胃接合部から下部食道へと移動すると考えられ、同部の様々な病態に関与している可能性がある。

研究目的

消化管内腔で外因性に発生する NO がバレット食道発生に促進的な作用を有するかを検討することを目的とした。

方法

食道に酸性の胃十二指腸混合物の逆流がおこることが証明されたラットバレット食道モデルを用い、外因性 NO の暴露の有無によりバレット食道発生にどのような影響があるかを検討した。

実験 1：ラットバレット食道モデルを作成後、術後 1 週目に 0.05%亜硝酸塩+1%アスコルビン酸投与群（NO 群）と非投与群(Control 群)とに振り分け、食道の炎症所見、バレット食道の発生率について振り分け後 2 週、4 週、8 週の段階で比較検討を行った。炎症所見は炎症面積率と炎症スコアで肉眼的に評価し、バレット食道の有無は組織学的に評価を行い、バレット食道の面積の指標としてバレット食道 Area index(AI)を算出した。また、バレット食道と診断した検体については CDX2、MUC2、MUC6 による免疫組織学的評価も併せて行った。

実験 2：また、同モデルを作成後、術後 1 週目に NO 群、Control 群の他、亜硝酸塩またはアスコルビン酸の単独投与群、NO 群において亜硝酸塩濃度を 0.3%へ上昇させた群、NO 群において PPI の同時投与を行った群へ振り分け、食道の炎症所見やバレット食道の発生について振り分け後 4 週において比較検討を行った。

結果

実験 1： 炎症面積率、炎症スコアは 2 週、4 週、8 週いずれの段階でも Control 群に比し NO 群で強い傾向がみられ、とくに炎症面積率は 2 週において、炎症スコアは 8 週において Control 群に比し NO 群で有意に上昇していた。バレット食道発生率、バレット食道 AI は 2 週、4 週、8 週いずれの段階においても Control 群に比し NO 群で高い傾向がみられ、とくにバレット食道発生率は 2 週、4 週において、バレット食道 AI は 4 週、8 週において Control 群に比し NO 群で有意に上昇して

いた。組織学的にバレット食道と診断した部位は免疫染色では CDX2、MUC2 陽性であり、ヒトにおける特殊円柱上皮と同様の所見であった。また、同部は MUC6 陽性であり、吻合した小腸は MUC6 陰性であったことから両者が組織学的に異なるものであることが示唆された。

実験 2： 亜硝酸塩またはアスコルビン酸の単独投与群においては Control 群に比し食道の炎症面積率、炎症スコア、バレット食道発生率、バレット食道 AI の有意な上昇は認められなかった。NO 群において亜硝酸塩濃度を 0.05% から 0.3% へ上昇させた群では、食道の炎症面積率、炎症スコア、バレット食道発生率、バレット食道 AI のさらなる上昇がみられた。一方 NO 群において PPI の同時投与を行ったところ食道の炎症面積率、炎症スコア所見やバレット食道発生率、バレット食道 AI は NO 群に比し低下傾向が認められた。

結論

外因性 NO はバレット食道の発生に促進的に働く可能性が示唆された。

今回我々がバレット食道と診断した組織は免疫組織学的にヒトにおける特殊円柱上皮の所見に一致し、これらは将来的に食道腺癌のリスクとなりうると考えられるため、下部食道で発生する NO がバレット食道のみならず、食道腺癌の促進因子にもなっている可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

研究背景

バレット食道は食道粘膜が扁平上皮から円柱上皮に置換された状態であり、食道腺癌の前癌病変と考えられている¹。本邦と異なり、欧米ではとくに腸上皮化生を伴う円柱上皮のみをバレット食道と定義し、それ以外は columnar lined esophagus ; CLE として区別して扱われている。胃十二指腸内容物の食道への逆流は、胃食道逆流症（Gastroesophageal reflux disease : GERD）において食道炎からバレット食道、ひいては食道腺癌へと発展する重要な危険因子であり、逆流物のなかでもとくに胃酸や胆汁酸がバレット食道の病因に深く関与していると報告されている¹⁻⁵。ヒトにおける胃食道逆流の大半は胃酸と胆汁酸の混合逆流であり、バレット食道の発生には両者の協調的な作用が関与していると考えられる⁶⁻⁸。その一方、ごく一部の GERD 患者のみがバレット食道へ発展するという事実^{1,9}から、胃酸、胆汁酸の逆流以外にもバレット食道発生に促進的に働く因子が存在すると考えられる。

ヒトが硝酸塩を多く含む食物を摂取すると、硝酸塩の唾液～腸管再循環（entro-salivary re-circulation of dietary nitrate）、口腔内細菌の存在により食後数時間にわたり唾液中に高濃度の亜硝酸塩が存在することが知られている^{10,11}。唾液中の亜硝酸塩は嚥下された後、食道・胃接合部内腔でアスコルビン酸を含む強酸性の胃液と反応し、速やかに一酸化窒素（NO）へと変換されることが証明されている¹²⁻¹⁵。唾液中の亜硝酸塩から化学的に NO が合成される部位は、亜硝酸塩が

最初に強酸性の胃酸と出会う地点であることから、胃酸が食道へ逆流する場合、NOの発生部位は食道・胃接合部からより口側の下部食道へと移動すると考えられる¹⁶。NOは高い脂質親和性をもつガスであり、消化管内腔で発生したNOは速やかに周囲組織中へ拡散すると考えられる。実際に動物モデルを用いた検討では、消化管内腔で発生したNOが周辺組織中へと拡散し上皮の防御機構を破綻させることが証明されており、食道・胃接合部付近での様々な病態に関与する可能性が考えられる¹⁷⁻¹⁹。

本研究では胃酸逆流のもと、下部食道内腔で発生するNOがバレット食道発生にも関与しているのではないかという仮説をたてた。

バレット食道の促進因子を検討するため、多くのラットバレット食道モデルが考案されているが²⁰、一般的には食道へ胃酸や胆汁酸が逆流するような外科的処置を行った動物モデルが使用されており、手術後約20～50週後に約60～100%の割合でバレット食道が発生すると報告されている²¹⁻²⁷。バレット食道は胃酸や胆汁酸への慢性的な暴露など管腔内の環境へ適応した結果発生すると考えられているが²⁸、本研究ではこれらに加えてさらにNOを暴露することでバレット食道発生が促進されるのではないかとこの仮説をたてた。

研究目的

本研究ではラットバレット食道モデルにおいて、下部食道で外因性に発生するNOが、バレット食道発生に促進的な作用を有するか検討することを目的とした。

研究方法

動物

本研究で使用した動物種は 7 週齢の雄性 Wistar ラット（日本クレア、東京）であり、ラットには実験前 1 週間の適応期間を与え、標準的飼育環境のもと 1 ケージにつきラット 2 匹を飼育した。すべての動物実験において「動物の保護及び管理に関する法律」（昭和 48 年制定）及び「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（昭和 55 年制定）を遵守し、東北大学動物実験施設基準審査委員会の承認（20 病動・6）を得て行った。

ラット動物モデル

本研究では、T. Zhang らによって報告された食道へ酸性の胃十二指腸混合液の逆流がおこるラットバレット食道モデル²⁹を用いた。本モデルでは術後 20 週で約 78% にバレット食道、約 50% に食道腺癌が発生することが報告されている²⁹。

24 時間の絶飲食後、0.5ml/kg のバルビツール酸（sodium pentobarbital、大日本住友製薬、大阪、日本）の腹腔内投与による全身麻酔を施行した後、バレット食道モデルを作成した。腹部を正中切開し、胃幽門輪から約 5mm 遠位の十二指腸を切断し、胃に付帯した近位断端を Treitz 靱帯から遠位約 4cm の空腸に端側吻合した。

その後、食道・胃接合部より 2mm 遠位で食道を切断し、食道近位断端を同吻合部位よりさらに 5mm 遠位に端側吻合した。（十二指腸遠位断端、食道遠位断端は縫合

閉鎖した。また、食道は迷走神経を温存しながら切断した。) 吻合糸には 7.0 ナイロン糸 (MONOSOF、タイコヘルスケア、日本) を用い、端側吻合部位は計 6 針で縫合した。(Figure 1)

術後 24 時間より給水、術後 48 時間より給餌をそれぞれ再開した。

実験プロトコール

実験 1

手術した 140 匹のラットのうち術後 1 週間生存しえた 119 匹のラットを無作為に下記の 2 群に振り分けた。(術後 1 週以内に死亡したラットの死因は出血、縫合不全などの手術操作に伴うものや、誤嚥などの麻酔に関連したものであった。)

Control 群 (60 匹) : 水道水、標準的飼料の投与群

NO 群 (59 匹) : 0.05%の亜硝酸塩 (Sigma、USA) + 1.0%アスコルビン酸 (Sigma、USA) 投与群

亜硝酸塩は飲料水中に、アスコルビン酸は粉末状の飼料中にそれぞれ投与した。NO 群において経口投与した亜硝酸塩は下部食道および食道空腸吻合部で胃酸を触媒としたアスコルビン酸との化学反応によって速やかに NO へ還元されると考えられる¹⁴。Asanuma らは、ラットへ亜硝酸塩とアスコルビン酸を同時投与した場合、実際に上記の化学反応を介して上部消化管内で NO が発生しうることを、NO 電極で直接 NO 濃度を測定することで証明している¹⁷。

2 群へ振り分けた後、2、4、8 週後に、両群より無作為に選んだ 15～20 匹のラットをエーテル麻酔下に頸椎脱臼し、全食道と吻合部を含む空腸を摘出した。摘出した組織を長軸方向に切開した後、生理食塩水で洗浄し、肉眼的炎症所見を検討するため写真を撮影した。その後摘出したすべての組織は組織学的検討に用いた。摘出した組織を 10%ホルマリンで固定した後、約 2mm の幅で長軸方向に 3 切片に分割しパラフィンへ包埋した。パラフィン包埋した組織は厚さ 4 μ m にスライスし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

実験 2

手術した 110 匹のラットのうち術後 1 週間後に生存しえた 95 匹のラットを無作為に下記の 6 群へ各群 15～20 匹ずつ振り分けた。(実験 1 と同様、術後 1 週以内に死亡したラットの死因は手術操作、麻酔に関連したものであった。)

I 群：水道水、標準的飼料の投与群 (Control 群)

II 群：1.0%アスコルビン酸投与群 (アスコルビン酸単独群)

III 群：0.05%亜硝酸塩投与群 (亜硝酸塩単独群)

IV 群：1.0%アスコルビン酸投与群+0.05%亜硝酸塩投与群 (baseline NO 群)

V 群：1.0%アスコルビン酸投与群+0.3%亜硝酸塩投与群 (高濃度 NO 群)

VI 群：1.0%アスコルビン酸投与群+0.05%亜硝酸塩投与群+0.1%プロトンポンプ阻害薬 (オメプラゾール、和光、大阪、日本、給餌中) (PPI 群)

実験 1 と同様に、亜硝酸塩は飲料水中に、アスコルビン酸は粉末状の飼料中にそれぞれ投与した。また、オメプラゾールの投与量は平均食事摂取量から 34.5 mg/kg/day となるよう設定した³⁰。振り分け後 4 週間の時点ですべてのラットをエーテル麻酔下に頸椎脱臼し、実験 1 と同様、肉眼所見、組織所見について比較検討を行った。

食道の炎症所見

食道の炎症所見は炎症スコア、炎症面積率を用いて肉眼的に評価を行った。評価は実験条件を blind にした上で異なる 3 名の実験者によって行われた。炎症スコアは過去の報告³¹に基づき、下記の如くスコア化した。

炎症スコア：

score 0 : appeared as normal glistening mucosa

score 1 : edematous mucosa with focal hemorrhagic spots

score 2 : multiple erosions with hematin attached

score 3 : linear ulcerations with yellowish exudates

score 4 : hemorrhagic coalesced ulcerations

また、食道の画像をコンピュータソフト Image J を用いて解析を行い、摘出した全食道面積に対する炎症面積の割合を炎症面積率として算出した。

バレット食道

バレット食道の発生率と範囲は組織学的に評価を行った。評価は実験条件を blind にした上で異なる 3 名の実験者によって行われた。吻合糸、食道と小腸の筋層の交錯部から吻合部を同定し、吻合部より口側に存在する杯細胞を伴った円柱上皮をバレット食道と定義した。バレット食道の範囲を評価するため、食道の各切片毎にバレット食道の長さ (mm) に検体の幅 (2mm) を乗じた近似面積を算出し、その総和をバレット食道 area index (AI) と定義して算出した。

免疫組織化学³²⁻³⁴

バレット食道の組織学的特徴を確認するため、CDX2、MUC2、MUC6 の発現の有無を免疫組織学的に検討した。一次抗体として MUC2(Santa Cruz Biotechnology, inc. USA 1:100)、MUC6(Abcam, 東京, 日本 1:200)、CDX2(BioGenex, USA, 1:100) を使用した。キシレンによる脱パラフィン後、エタノール処理を行い、0.3% 過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。10mM、pH6.0 のクエン酸バッファーで 95℃、5 分間の煮沸後、室温に 30 分間放置して抗原賦活化処理を行った後、第一抗体を 4℃で一晩反応させた。その後第 2 抗体を 30 分間反応させた後、ビオチン-アビジン複合体を反応させ、最後にジアミノベンチジン(DAB)を用いて発色させた。ヘマトキシリン染色で核染色、エタノールで脱水、キシレン処理後、スライドを作成した。

統計

本実験で得られた結果は平均±標準偏差で表記し、各群間の比較検討は **unpaired t-test** を用いて行った。また、バレット食道発生率は **Fischer-test** を用いて比較検討を行った。評価は **p 値が 0.05 未満**を有意とした。

研究結果

実験 1

経過

119 匹中、実験の期間中生存しえた 102 匹のラットを検討対象とし、経過中死亡した 17 匹のラット（Control 群 8 匹、NO 群 7 匹）は検討から除外した。経過中死亡したラットの死因は、食道炎に伴う食道潰瘍、狭窄に関連したもの（経口摂取低下に伴う栄養不良、誤嚥性肺炎、消化管穿孔など）であった。生存しえた 102 匹のラットの内訳は以下の如くである。

2 週群：Control 群 15 匹、NO 群 15 匹

4 週群：Control 群 20 匹、NO 群 20 匹

8 週群：Control 群 16 匹、NO 群 16 匹

ラット死亡率に関して NO 群と Control 群の間に有意差を認めず、体重に関しても 2 週、4 週、8 週いずれにおいても 2 群間に有意差を認めなかった。（Table 1）
また、食事摂取量、飲水量に関しても NO 群と Control 群の間に有意差を認めなかった。NO 群のラットが一日あたりに消費した平均食事摂取量、平均飲水量はそれぞれ約 10g、約 30ml であり、これらは約 100mg のアスコルビン酸、約 15mg の亜硝酸塩に相当する。

食道の肉眼的所見としては、両群のラットにおいて下部食道の粘膜肥厚、びらん、潰瘍形成などの炎症所見を認め、ときに出血を伴うような深い潰瘍形成を認めた。

バレット食道を肉眼的に同定することは困難であった。また、両群において食道に明らかな腫瘍性病変を認めなかった。

食道の組織学的所見としては、びらん、潰瘍形成、再生に伴う粘膜肥厚、基底層の過形成などに特徴付けられる食道炎の所見を両群のラットにおいて認めた。ときに食道と十二指腸の吻合部よりも口側の食道に杯細胞を伴う円柱上皮を認め、それらと吻合した小腸の間には扁平上皮島の介在を認めた。(Figure 2) 本研究ではこのような円柱上皮をバレット食道と定義した。一部のラットではバレット食道の表面は扁平上皮で覆われていた。(Figure 2) また、両群において食道に明らかな異形成や癌を認めなかった。

食道の炎症所見

両群において経過観察期間が長期化するほど、炎症の範囲、程度はより高度になる傾向を認めた。2 週、4 週、8 週いずれの時期においても平均炎症スコアは Contol 群に比し NO 群で高い傾向を認め、とくに 8 週では有意な炎症スコアの上昇を認めた。(p<0.01) 同様に、平均炎症面積率に関しても 2 週、4 週、8 週いずれの時期においても Contol 群に比し NO 群で高い傾向を認め、とくに 2 週では有意な炎症面積率の上昇を認めた。(p<0.05) (Figure 3)

バレット食道

2 週の段階で Control 群ではバレット食道の発生を認めなかったのに対し、NO 群では約 26%にバレット食道の発生を認めた。また、4 週、8 週でのバレット食道発生率は Control 群でそれぞれ 10%、43%、NO 群でそれぞれ 40%、69%であり、2 週、4 週、8 週いずれの時期においても Control 群に比し NO 群でバレット食道発生率が高い傾向を認め、とくに 2 週、4 週では有意な上昇を認めた。 $(p<0.05)$ また、バレット食道発生率に加えてバレット食道 AI も NO 群で Control 群に比し常に高い傾向がみられ、とくに 4 週、8 週では有意な上昇を認めた。 $(p<0.01, p<0.05)$ (Figure 4) このことは外因性 NO の投与がバレット食道発生のタイミングを早めたことに加え、バレット食道の範囲を拡大したことを示している。

免疫組織化学

本研究でバレット食道と定義した食道組織では、CDX2、MUC2 が杯細胞で陽性所見を示し、ヒトの特殊円柱上皮の所見に類似する所見を呈した^{32,35}。また、バレット食道内の深部の円柱上皮で MUC6 の陽性所見を認めたが、吻合した小腸では MUC6 は陰性所見であったことから、両者が組織学的に明らかに異なるものであることがうかがえる。(Figure 5) 以上の所見はバレット食道と診断したすべての組織で認められた所見であり、Control 群と NO 群でその所見に明らかな差異はなかった。このことはバレット食道の免疫組織学的特徴が Control 群と NO 群とに差異がなかったことを示している。

実験 2

経過

95 匹中、実験期間中生存しえた 80 匹のラットを検討対象とし、合併症により経過中死亡した 15 匹のラット（Ⅰ群 3 匹、Ⅱ群 4 匹、Ⅲ群 2 匹、Ⅳ群 2 匹、Ⅴ群 1 匹、Ⅵ群 3 匹）は検討から除外した。実験 1 と同様に、経過中死亡したラットの死因は、食道炎に伴う食道潰瘍、狭窄に関連したもの（経口摂取低下に伴う栄養不良、誤嚥性肺炎、消化管穿孔など）であった。生存しえた 80 匹のラットの内訳は下記の如くである。

Ⅰ群：17 匹 Ⅱ群：11 匹、Ⅲ群：13 匹、Ⅳ群：13 匹、Ⅴ群：14 匹、Ⅵ群：12 匹
ラットの死亡率、体重増加に関して 6 群間に有意差を認めなかった。

食道の炎症所見

1.0%アスコルビン酸または 0.05%亜硝酸塩の単独投与群（Ⅱ、Ⅲ群）では Control 群（Ⅰ群）に比し炎症所見の増強を認めなかった。両者を同時投与した場合、base line NO 群（Ⅳ群）では Control 群に比し一部で有意な炎症所見の増強を認め（ $p<0.05$ ）、さらに亜硝酸塩濃度を 0.05%から 0.3%へ上昇させた高濃度 NO 群（Ⅴ群）では Control 群や base line NO 群に比しさらなる炎症所見の増強を認めた。（ $p<0.01$ ） また、1.0%アスコルビン酸と 0.05%亜硝酸塩に加えてプロトンポンプ

阻害剤を投与した PPI 群 (VI群) では、base line NO 群に比し炎症所見が軽減された。(Figure 6)

バレット食道

1.0%アスコルビン酸または 0.05%亜硝酸塩の単独投与群 (II、III群) では、Control 群 (I 群) に比しバレット食道発生率、バレット食道 AI の増強を認めなかったのに対し、両者を同時投与した場合、base line NO 群 (IV群) ではその増強効果を認め、さらに亜硝酸塩濃度を 0.05%から 0.3%へ上昇させた高濃度 NO 群 (V群) ではバレット食道発生率、バレット食道 AI のさらなる増強を認めた。1.0%アスコルビン酸と 0.05%亜硝酸塩に加えてプロトンポンプ阻害剤を投与した PPI 群 (VI群) では、base line NO 群に比しバレット食道発生率は低下し、バレット食道 AI は有意な減少を認めた。(p<0.05) (Figure 7)

考察

本研究では、食道へ胃酸の逆流がおこるラットのバレット食道モデルにおいて、亜硝酸塩とアスコルビン酸の投与により下部食道で発生する外因性の NO が、食道の炎症所見を増強し、バレット食道の出現するタイミングを早め、さらにその範囲も拡大することを、術後比較的早期の段階で検討を行うことで明らかにした。本研究は唾液中の亜硝酸塩に由来する外因性の NO がバレット食道発生に関わる新たな因子となりうることを示している。

外科的手術により食道に胃酸や胆汁酸の逆流をひきおこすことでバレット食道や食道腺癌を発生させるラットの食道炎モデルが数多く知られているが²¹⁻²⁷、その多くは、食道と十二指腸の吻合部から胃が離れているため、胃酸は食道に達する前に十二指腸液によって中和されてしまう³⁶。しかし、実際のヒト GERD 患者において胃酸は十二指腸液によって中和されることなく、酸性を維持した状態で食道へ逆流することが知られており⁶⁻⁸、これらの従来ラットの食道炎モデルはヒト GERD 患者でみられる胃酸、十二指腸内容物の混合逆流を正確には反映していない。これら従来のモデルと異なり、T. Zhang らが報告した新しいラット逆流モデル (Figure 1) は、胃が食道と十二指腸の吻合部に近い位置に存在するため、胃酸が十二指腸液によって中和されることなく食道へ達することが証明されており、ヒト GERD 患者でみられるのと同様な混合逆流をつくりだすことに成功している。ヒト GERD 患者における混合逆流を再現していること、下部食道で NO を発生するのに不可欠な

食道への胃酸の逆流がおこるモデルであることから、筆者は T. Zhang らのモデルを採用した¹⁴。実際にプロトンポンプ阻害剤による酸分泌抑制を行ったところ、亜硝酸塩、アスコルビン酸同時投与によるバレット食道発生促進効果が減弱されたことから、本モデルにおけるバレット食道発生に対する胃酸の関与が裏付けられた。

胃液中のような高酸状態において亜硝酸塩は速やかに nitrous acid (HNO_2) へ変換されるが、十分量のアスコルビン酸が共存した場合、 HNO_2 はさらに NO へと変換される¹²⁻¹⁴。本研究において食道炎の増強効果、バレット食道発生の促進効果は亜硝酸塩単独投与群では認められず、アスコルビン酸の同時投与を要したという事実は、食道炎の増強、バレット食道発生を促進したのは HNO_2 ではなく NO であるということを裏付けている。

NO がバレット食道発生を促進する機序の一端として、炎症を介する間接作用が考えられる。従来からバレット食道は慢性的な食道の粘膜傷害に対する適応反応の結果発生するものと考えられているが^{1,2}、本研究では NO 群では Control 群に比し、食道炎の程度や範囲が有意に増強、増大されたことから、NO が食道炎自体を増強することで間接的にバレット食道発生を促進するという機序が考えられる。

Ishiyama らは、幽門輪をシリコンリングで狭細化することで食道へ胃酸の逆流がおこるラット食道炎モデル³⁷を用い、食道内で発生した外因性の NO が逆流性食道炎による粘膜傷害を増強することを報告した³⁰。その主な機序は、食道炎組織中の炎症細胞から産生されるスーパーオキシドと消化管内腔で発生した NO とが反

応し、強力な組織傷害性を有するペルオキシナイトライトが発生することである。

本研究においても外因性 NO により食道の粘膜傷害が有意に増強されることを確認したが、食道の粘膜傷害の程度に関しては Ishiyama らの報告と本研究との間には大きな差異がみられた。すなわち、Ishiyama らのモデルでは外因性 NO の暴露群では Control 群に比し数倍の粘膜傷害の増強が認められたが、本研究では外因性 NO 暴露群では Control 群に比し有意ではあるがわずかな粘膜傷害の増強を認めるのみであった。逆流内容物の性質の差異（胃酸単独の逆流 v.s. 混合逆流）や、投与した亜硝酸塩の濃度の差異（0.1% v.s. 0.05%）がその原因と考えられる。

また、NO は生体内での重要な生理活性物質であり、シグナル伝達を司る様々な遺伝子の発現を誘導することが知られている^{38,39} ため、NO がバレット食道発生を促進する機序として、炎症反応を介さない、何らかの直接作用を有する可能性がある。とくに従来からバレット食道発生に促進的に働く因子と考えられてきた胃酸や胆汁酸¹⁻⁵ との間に何らかの協調作用を有する可能性がある。

バレット食道や食道腺癌を研究するために様々な動物モデルが考案されているが、一般的に食道内へ胃酸のみが逆流するモデルでは、バレット食道は高率には発生しない²⁵のに対し、十二指腸内容物の逆流をきたすモデルでは高率にバレット食道や食道腺癌が発生することが示されている^{25,26,27,40}。このことから十二指腸内容物がバレット食道発生には重要な役割をはたしていることが示唆される。

最近の研究で、食道へ胃酸のみの逆流がおこるラット食道炎モデルを作成後、発

癌物質を投与の上、亜硝酸塩とアスコルビン酸を投与することで外因性 NO を暴露し、長期経過を検討した報告⁴¹がある。それによれば、32 週後に食道扁平上皮癌の発生は認められたものの、バレット食道や食道腺癌の発生は認められなかったとの報告されている。このことから食道内での NO の発生の観点からは、胃酸逆流は必須であるが、胃酸逆流とそれにより発生する NO のみではバレット食道発生が促進されないことがわかる。

一方、食道へ胃酸と胆汁酸の混合逆流がおこるラットのバレット食道モデルへ外因性 NO を暴露した本研究では、結果としてバレット食道発生が促進されたことから、食道へ逆流する十二指腸内容物によってバレット食道はまずはじめに誘導され、外因性 NO はその発育過程を二次的に促進するものと考えられる。

近年、それを裏付ける NO による形質転換促進作用に関する報告があり、Vaninetti らはヒト扁平上皮細胞株である Het1A において、NO ドナー単独の刺激では CDX2 の発現を誘導しないものの、NO ドナーと胆汁酸による混合刺激を行うと、胆汁酸単独の刺激に比し mRNA レベルで 98 倍もの CDX2 の発現増強を認めたと報告している⁴²。CDX2 はバレット食道発生の過程で食道における腸上皮化生を誘導する主要な遺伝子であり^{2,43,44}、この *in vitro* における研究結果は、外因性の NO 暴露が胆汁酸逆流により誘導されたバレット食道発生を促進したという本研究の *in vivo* での研究結果と深く関連していると考えられる。すなわち、胆汁酸による食道扁平上皮の CDX2 発現を NO が促進することが示唆され、NO によるバレッ

ト食道発生の直接作用と考えられる。

本研究でラットへ投与した 0.05%という亜硝酸塩の濃度は約 7mM に相当するが、以前の研究で、硝酸塩を豊富に含む食物を摂取した後のヒト唾液内の亜硝酸塩濃度は約 2–5mM に達することが報告されており^{10,11,16}、本研究で用いた亜硝酸塩濃度はヒトにおける生理的濃度に近いものといえる。一方、本研究では亜硝酸塩と反応させて NO を発生させるために十分量のアスコルビン酸を投与した。ヒトの健常な胃においてはアスコルビン酸が断続的に分泌されており、野菜などの様々な食事中にもビタミンが含まれているが、本研究で用いた濃度はヒトにおける生理的範囲を越えている。しかしながら、そのような高濃度の状態はビタミンのサプリメントの使用などで起こりえる状態であり、また、食事中的ポリフェノールなどの抗酸化物質もアスコルビン酸と同様に、酸性条件下で亜硝酸塩からの NO 発生を促進する因子として知られており⁴⁵⁻⁴⁷、亜硝酸塩を還元する条件としてヒトでも同等の状態が起こりえるものとする。

本研究によりラットモデルにおける外因性 NO のバレット食道発生への関与が証明された。動物種の違いや手術下という特殊な実験条件は、実際のヒトにおける病態を必ずしも反映しない点は注意を要するが、胃酸の食道内逆流を有するヒトにおいては、硝酸塩を含む食事摂取後、数時間は食道への胃酸逆流のたびに下部食道が必然的に高濃度の NO に曝されることから、本研究結果は GERD を有するヒトの病態と密接に関連すると考えられる。

結論として、本研究は従来から認識されている胃酸や胆汁酸、膵液に加え¹⁻⁵、食道内腔で発生する NO がバレット食道発生に促進的に働く可能性を示している。本研究でバレット食道と診断した円柱上皮は免疫組織学的にヒトにおける特殊円柱上皮に類似する所見であったが^{32,35}、このような特殊円柱上皮はバレット腺癌へと発展しうる前癌病変と考えられている⁴⁸。近年、バレット食道由来の細胞株を用いた *in vitro* の研究において NO が DNA 損傷を惹起することも報告されており⁴⁹、食道内腔の NO がバレット食道発生のみならず、その癌化にも関与している可能性も考えられ興味深く、今後さらなる検討が必要と考えられる。

参考文献

1. Shaheen NJ, Richter JE. :Barrett's oesophagus. Lancet. 2009 Mar 7;373(9666):850-61. Review.
2. Souza RF, Krishnan K, Spechler SJ. :Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008 Aug;295(2):G211-8. Epub 2008 Jun 12. Review.
3. Guillem PG. :How to make a Barrett esophagus: pathophysiology of columnar metaplasia of the esophagus. Dig Dis Sci. 2005 Mar;50(3):415-24. Review.
4. Li Y, Martin RC 2nd. :Reflux injury of esophageal mucosa: experimental studies in animal models of esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. Dis Esophagus. 2007;20(5):372-8. Review.
5. Vaezi MF, Singh S, Richter JE. :Role of acid and duodenogastric reflux in esophageal mucosal injury: a review of animal and human studies. Gastroenterology. 1995 Jun;108(6):1897-907. Review.

6. Vaezi MF, Richter JE. :Role of acid and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1996 Nov;111(5):1192-9.

7. Champion G, Richter JE, Vaezi MF, et.al. :Duodenogastroesophageal reflux: relationship to pH and importance in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 1994 Sep;107(3):747-54.

8. Koek GH, Sifrim D, Lerut T, et.al. :Multivariate analysis of the association of acid and duodeno-gastro-oesophageal reflux exposure with the presence of oesophagitis, the severity of oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut*. 2008 Aug;57(8):1056-64. Epub 2008 Apr 10.

9. Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, et al. :Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*. 1987 Jan;92(1):118-24.

10. McKnight GM, Smith LM, Drummond RS, et.al.:Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*. 1997 Feb;40(2):211-4.

11. Pannala AS, Mani AR, Spencer JP,et.al. :The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radic Biol Med.* 2003 Mar 1;34(5):576-84.
12. Iijima K, Henry E, Moriya A,et.al. :Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology.* 2002 May;122(5):1248-57.
13. McColl KE. :When saliva meets acid: chemical warfare at the oesophagogastric junction. *Gut.* 2005 Jan;54(1):1-3.
14. Iijima K, Fyfe V, McColl KE. :Studies of nitric oxide generation from salivary nitrite in human gastric juice. *Scand J Gastroenterol.* 2003 Mar;38(3):246-52.
15. Suzuki H, Iijima K, Moriya A,et.al. :Conditions for acid catalysed luminal nitrosation are maximal at the gastric cardia. *Gut.* 2003 Aug;52(8):1095-101.
16. Suzuki H, Iijima K, Scobie G,et.al. :Nitrate and nitrosative chemistry within Barrett's oesophagus during acid reflux. *Gut.* 2005 Nov;54(11):1527-35.
17. Asanuma K, Iijima K, Ara N,et.al. :Fe-S cluster proteins are intracellular targets for nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction. *Nitric Oxide.* 2007 Jun;16(4):395-402.

18. Asanuma K, Iijima K, Sugata H, et.al. :Diffusion of cytotoxic concentrations of nitric oxide generated luminally at the gastro-oesophageal junction of rats. Gut. 2005 Aug;54(8):1072-7.
19. Ara N, Iijima K, Asanuma K, et.al. :Disruption of gastric barrier function by luminal nitrosative stress: a potential chemical insult to the human gastro-oesophageal junction. Gut. 2008 Mar;57(3):306-13.
20. Koak Y, Winslet M. :Changing role of in vivo models in columnar-lined lower esophagus. Dis Esophagus. 2002;15(4):271-7. Review.
21. Chen X, Yang G, Ding WY, et.al. :An esophagogastrroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload. Carcinogenesis. 1999 Sep;20(9):1801-8.
22. Pera M, Brito MJ, Poulsom R, et.al. :Duodenal-content reflux esophagitis induces the development of glandular metaplasia and adenosquamous carcinoma in rats. Carcinogenesis. 2000 Aug;21(8):1587-91.
23. Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, et.al. :Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):1101-12.

24. Kumagai H, Mukaisho K, Sugihara H, et.al. :Cell kinetic study on histogenesis of Barrett's esophagus using rat reflux model. Scand J Gastroenterol. 2003 Jul;38(7):687-92.
25. Miwa K, Sahara H, Segawa M, et.al. :Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. Int J Cancer. 1996 Jul 17;67(2):269-74.
26. Fein M, Peters JH, Chandrasoma P, et.al. :Duodeno-esophageal reflux induces esophageal adenocarcinoma without exogenous carcinogen. J Gastrointest Surg. 1998 May-Jun;2(3):260-8.
27. Pera M, Cardesa A, Bombi JA, et.al. :Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. Cancer Res. 1989 Dec 1;49(23):6803-8.
28. Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ, et.al. : a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Dec;293(6):G1106-13. Epub 2007 Oct 11.

29. Zhang T, Zhang F, Han Y, et.al. :A rat surgical model of esophageal metaplasia and adenocarcinoma-induced by mixed reflux of gastric acid and duodenal contents. *Dig Dis Sci.* 2007 Nov;52(11):3202-8. Epub 2007 Mar 28.
30. Ishiyama F, Iijima K, Asanuma K, et.al. :Exogenous luminal nitric oxide exacerbates esophagus tissue damage in a reflux esophagitis model of rats. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(5):527-37.
31. Oh TY, Lee JS, Ahn BO, et.al. :Oxidative stress is more important than acid in the pathogenesis of reflux oesophagitis in rats. *Gut.* 2001 Sep;49(3):364-71.
32. Arul GS, Moorghen M, Myerscough N, et.al. :Mucin gene expression in Barrett's oesophagus: an in situ hybridisation and immunohistochemical study. *Gut.* 2000 Dec;47(6):753-61.
33. Burjonrappa SC, Reddimasu S, Nawaz Z, et.al. :Mucin expression profile in Barrett's, dysplasia, adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Indian J Cancer.* 2007 Jan-Mar;44(1):1-5.

34. Ishikawa A, Sasaki M, Ohira S, et.al. :Aberrant expression of CDX2 is closely related to the intestinal metaplasia and MUC2 expression in intraductal papillary neoplasm of the liver in hepatolithiasis. Lab Invest. 2004 May;84(5):629-38.
35. Warson C, Van De Bovenkamp JH, Korteland-Van Male AM, et.al. :Barrett's esophagus is characterized by expression of gastric-type mucins (MUC5AC, MUC6) and TFF peptides (TFF1 and TFF2), but the risk of carcinoma development may be indicated by the intestinal-type mucin, MUC2. Hum Pathol. 2002 Jun;33(6):660-8.
36. Fein M, Fuchs KH, DeMeester TR, et.al. :Evaluation of the intestinal microflora in the rat model for esophageal adenocarcinoma. Dis Esophagus. 2000;13(1):39-43.
37. Omura N, Kashiwagi H, Chen G, et.al. :Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. Scand J Gastroenterol. 1999 Oct;34(10):948-53.
38. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. :Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. FASEB J. 2000 Oct;14(13):1889-900. Review.

39. Hemish J, Nakaya N, Mittal V, et.al. :Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):42321-9. Epub 2003 Aug 7.
40. Mirvish SS. :Studies on experimental animals involving surgical procedures and/or nitrosamine treatment related to the etiology of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 1997 Aug 19;117(2):161-74. Review.
41. Kuroiwa Y, Okamura T, Ishii Y, et.al. :Enhancement of esophageal carcinogenesis in acid reflux model rats treated with ascorbic acid and sodium nitrite in combination with or without initiation. *Cancer Sci.* 2008 Jan;99(1):7-13. Epub 2007 Oct 22.
42. Vaninetti N, Williams L, Geldenhuys L, et.al. :Regulation of CDX2 expression in esophageal adenocarcinoma. *Mol Carcinog.* 2009 May 4. [Epub ahead of print]
43. Phillips RW, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. :Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. *Am J Surg Pathol.* 2003 Nov;27(11):1442-7.

44. Eda A, Osawa H, Satoh K, et.al. :Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. J Gastroenterol. 2003;38(1):14-22.
45. Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, et.al. :Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. Free Radic Biol Med. 2007 Nov 1;43(9):1233-42. Epub 2007 Jun 13.
46. Takahama U, Tanaka M, Hirota S. :Interaction between ascorbic acid and chlorogenic acid during the formation of nitric oxide in acidified saliva. J Agric Food Chem. 2008 Nov 12;56(21):10406-13. Epub 2008 Oct 16.
47. Peri L, Pietraforte D, Scorza G, et.al. :Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: a new biological function for polyphenols with a catechol group? Free Radic Biol Med. 2005 Sep 1;39(5):668-81.
48. Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, et.al. :Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. Gut. 2004 Aug;53(8):1070-4.

49. Nicholas J. Clemons, Kenneth E.L. McColl, Rebecca C. Fitzgerald, et al. :Nitric oxide and acid induce double-strand DNA breaks in Barrett's esophagus carcinogenesis via distinct mechanisms. *Gastroenterology*. 2007 Oct;133(4) 1198-209

FIGURE LEGENDS

Figure 1: 本研究で用いたラットバレット食道モデル 本モデルは食道と十二指腸を端側吻合し、さらにその口側で胃と十二指腸を端側吻合することにより作成された。本モデルでは胃が食道と十二指腸の吻合部に近接しているため、胃酸は十二指腸液によって中和されることなく食道へ達し、酸性の胃十二指腸混合物の食道への逆流がおこることが証明されている。

Figure 2: 実際のバレット食道例（NO 群、4 週） **A):食道の肉眼所見** 下部食道粘膜は肥厚し、びらん、潰瘍の散在を認めた。バレット食道を肉眼的に同定するのは困難であった。点線部は食道と十二指腸の吻合部を示し、実線部は食道と十二指腸の割線を示している。割線部の組織所見を（B）に示す。 **B): 食道・十二指腸吻合部の組織所見（弱拡大像）** 吻合部よりも口側の食道にバレット食道を認め、バレット食道と吻合した十二指腸の間には扁平上皮島の介在を認めた。（H&E 染色、40 倍）。 **C): バレット食道の組織所見（強拡大像）** バレット食道は杯細胞を伴う円柱上皮からなり、表面を扁平上皮で覆われていた。（H&E 染色、400 倍）

Figure 3: NO 群、Control 群における食道の炎症所見の経時変化（実験 1） 食道の炎症所見は炎症スコアと平均炎症面積率を用いて肉眼的に評価した。NO 群、Control 群ともに食道炎の所見は時間経過とともに高度となる傾向を認め、炎症の範囲と程度は NO 群において Control 群に比し常に高度であった。とくに炎症スコ

アは 8 週において、平均炎症面積率は 2 週において NO 群で Control 群に比し、有意に上昇していた。 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, N.S.: not significant.)

Figure 4: NO 群、Control 群におけるバレット食道発生の経時変化 (実験 1)

バレット食道はバレット食道発生率とバレット食道 area index を用いて組織学的に評価した。2 週では Control 群ではバレット食道発生が認められていないのに対し、NO 群では約 26% にバレット食道が発生しており、4 週、8 週においてもバレット食道発生率は NO 群で Control 群に比し常に高い傾向を認めた。とくに 2 週、4 週では NO 群で Control 群に比しバレット食道発生率は有意に上昇していた。バレット食道 area index (AI) は NO 群で Control 群に比し常に高い傾向がみられ、とくに 4 週、8 週では有意な上昇を認めた。 (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, N.S.: not significant.)

Figure 5: バレット食道の免疫染色所見(A: CDX2, B: MUC2, C: MUC6).

バレット食道と定義した円柱上皮において、杯細胞で CDX2、MUC2 が陽性所見を示し、深部の円柱上皮では MUC6 が陽性所見を示した。一方、MUC6 は吻合した十二指腸では陽性所見を認めず、バレット食道が吻合した十二指腸とは異なる組織であることを確認した。

Figure 6: I ～VI群の食道の炎症所見の比較（実験 2） 食道の炎症所見は炎症スコアと平均炎症面積率により肉眼的に評価した。実験 1 と同様に亜硝酸塩、アスコルビン酸を同時投与した場合、Control 群に比し炎症所見の増強を認めたが、亜硝酸塩もしくはアスコルビン酸の単独投与では炎症所見の増強を認めなかった。亜硝酸塩、アスコルビン酸の同時投与群において亜硝酸塩の濃度を 0.05%から 0.3%へ上昇させた場合、さらに炎症所見が増強された。亜硝酸塩、アスコルビン酸の同時投与群においてプロトンポンプ阻害剤を併用した場合、プロトンポンプ阻害剤を併用しなかった場合に比し有意差は認めないものの炎症所見が軽減された。（* : $p<0.05$ v.s. I 群、 ** : $p<0.01$ v.s. I 群、 # : $p<0.05$ v.s. IV 群 N.S.: not significant.）

Figure 7: I ～VI群のバレット食道発生の比較（実験 2） バレット食道はバレット食道発生率とバレット食道 area index を用いて組織学的に評価した。硝酸塩、アスコルビン酸を同時投与した場合、Control 群に比しバレット食道発生率、バレット食道 AI の上昇を認めたが、亜硝酸塩もしくはアスコルビン酸の単独投与ではそれらの上昇を認めなかった。亜硝酸塩、アスコルビン酸の同時投与群において亜硝酸塩の濃度を 0.05%から 0.3%へ上昇させた場合、バレット食道発生がさらに促進された。亜硝酸塩、アスコルビン酸の同時投与群においてプロトンポンプ阻害剤を併用した場合、プロトンポンプ阻害剤を併用しなかった場合に比し有意にバレット食道発生を抑制した。（* : $p<0.05$ v.s. I 群、 ** : $p<0.01$ v.s. I 群、 # : $p<0.05$ v.s. IV

群 N.S.: not significant.)

Table 1: NO 群、Control 群の体重変化（実験 1）2 週、4 週、8 週いずれにおいても NO 群と Control 群に有意な体重差を認めなかった。

Figure 1

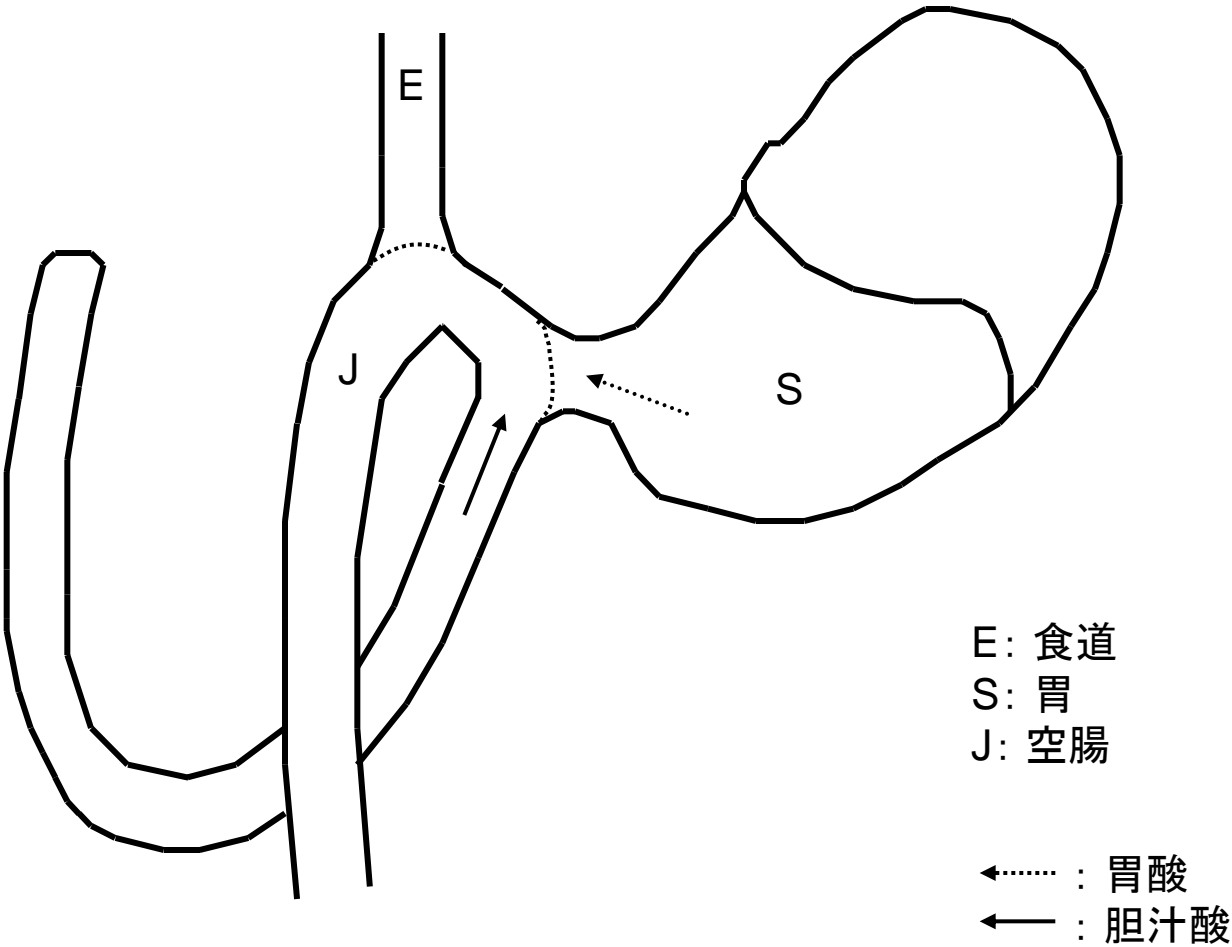


Figure 2

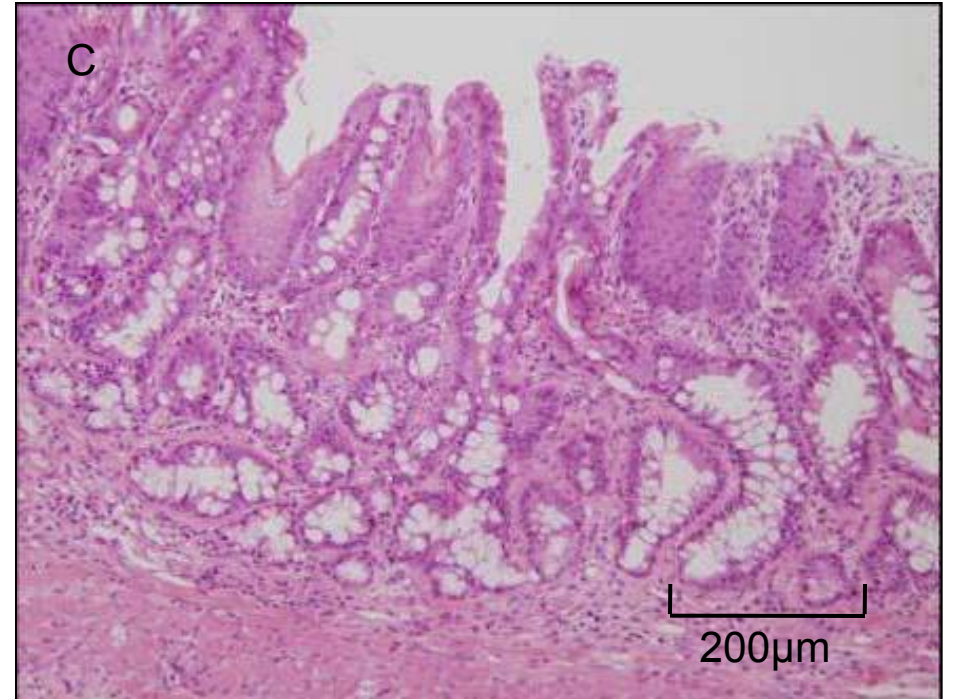
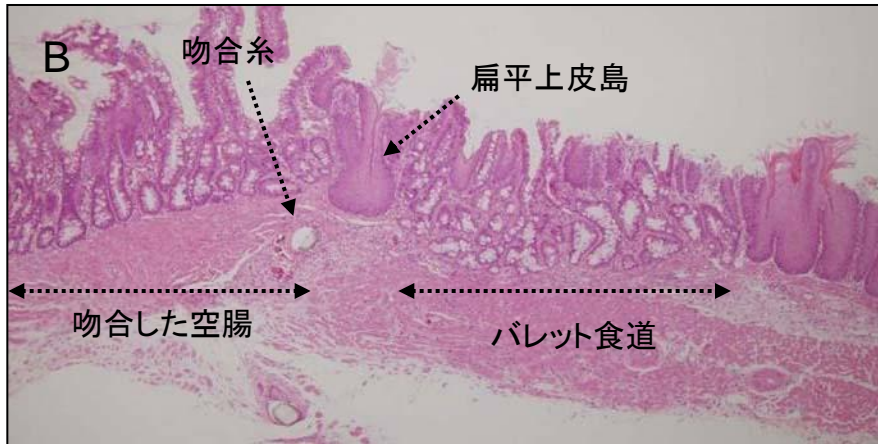
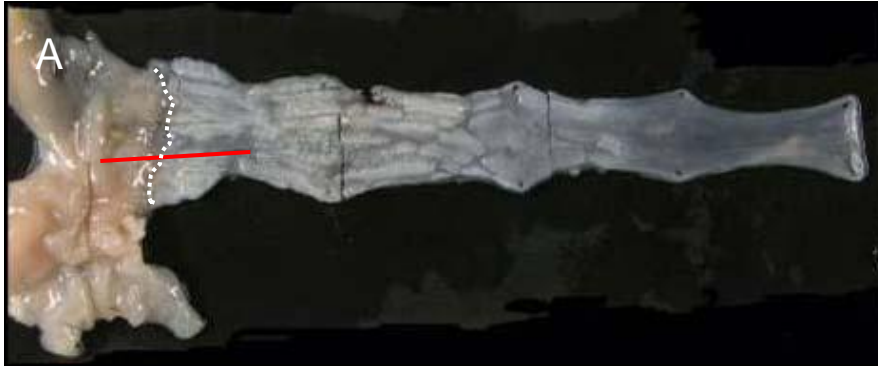


Figure 3

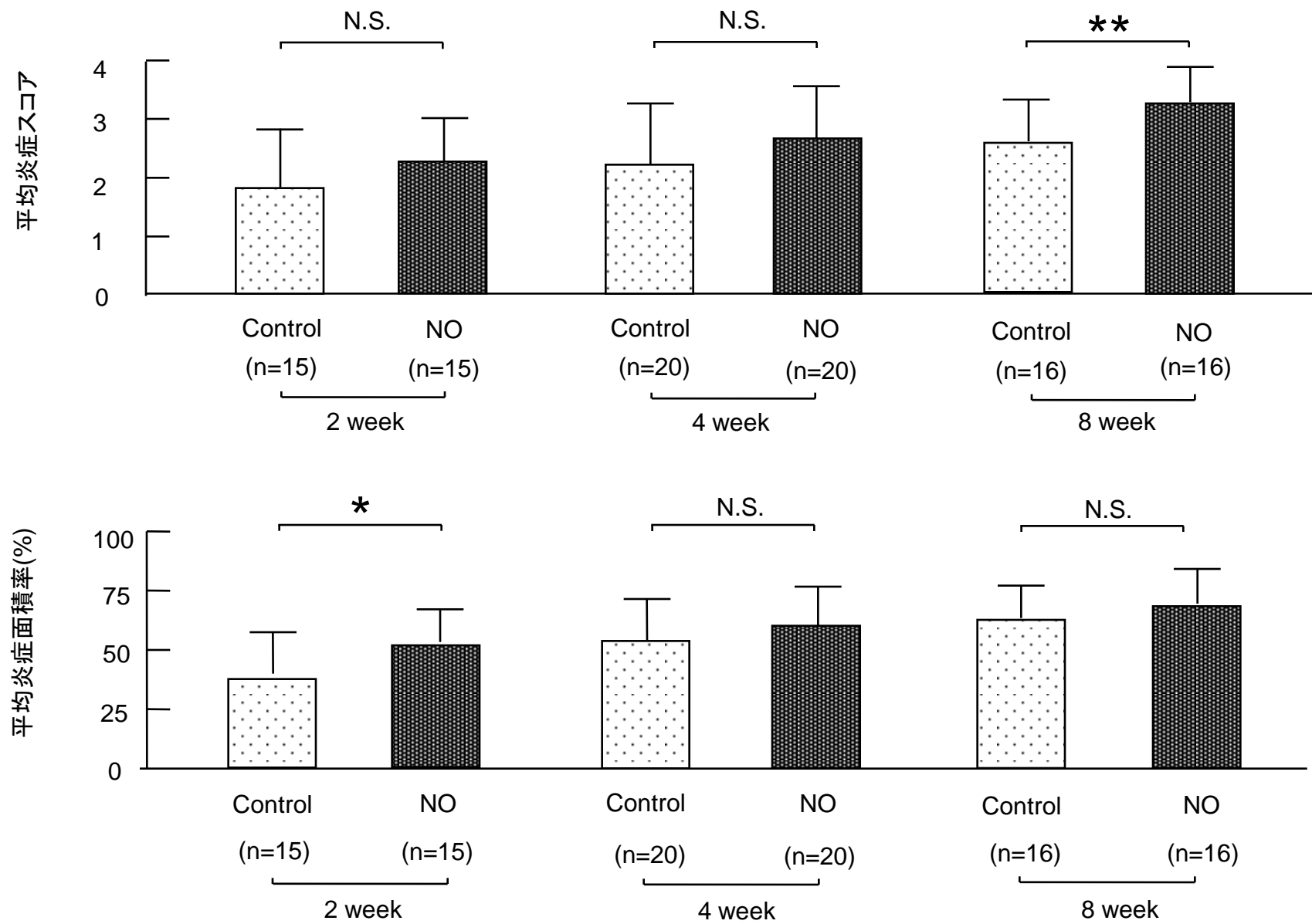


Figure 4

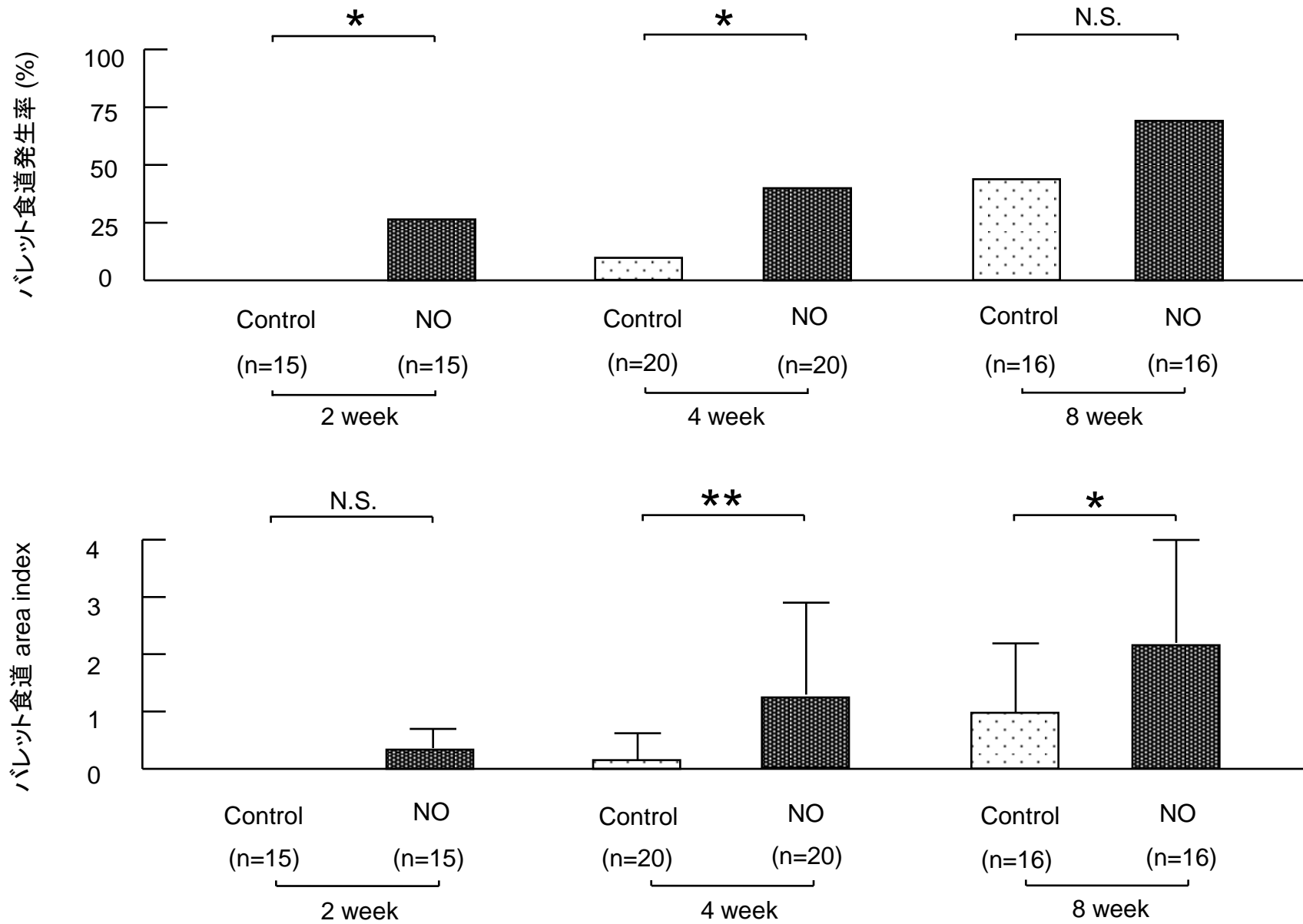


Figure 5

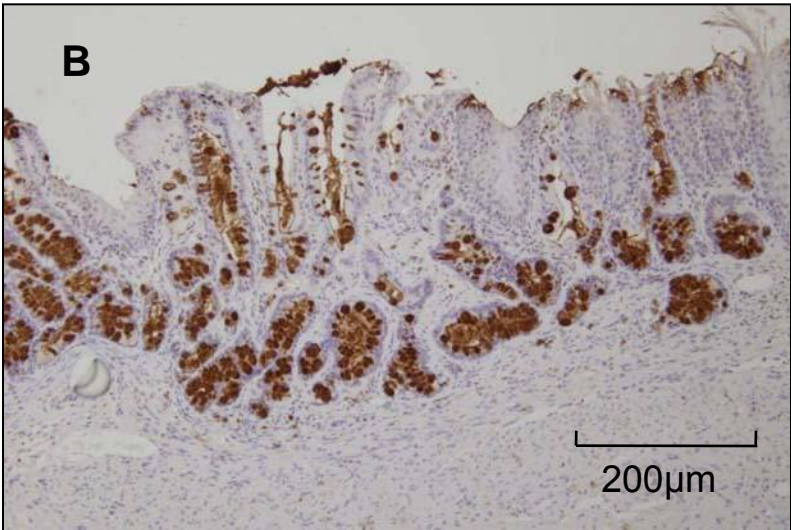
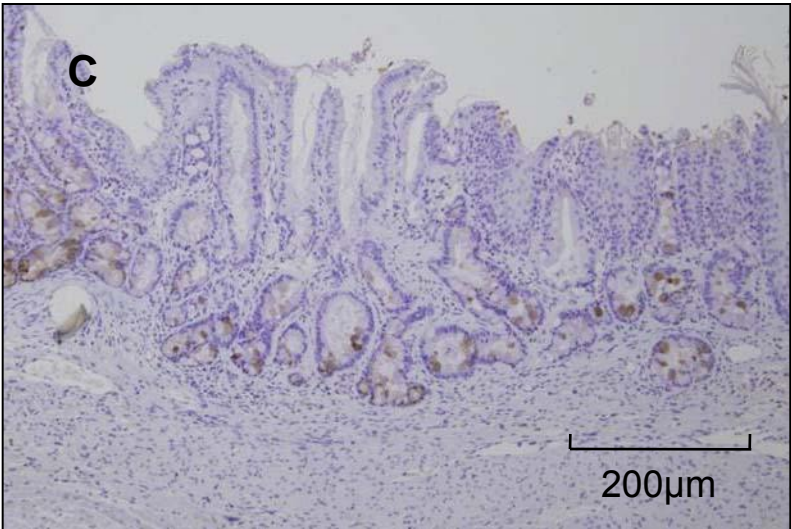


Figure 6

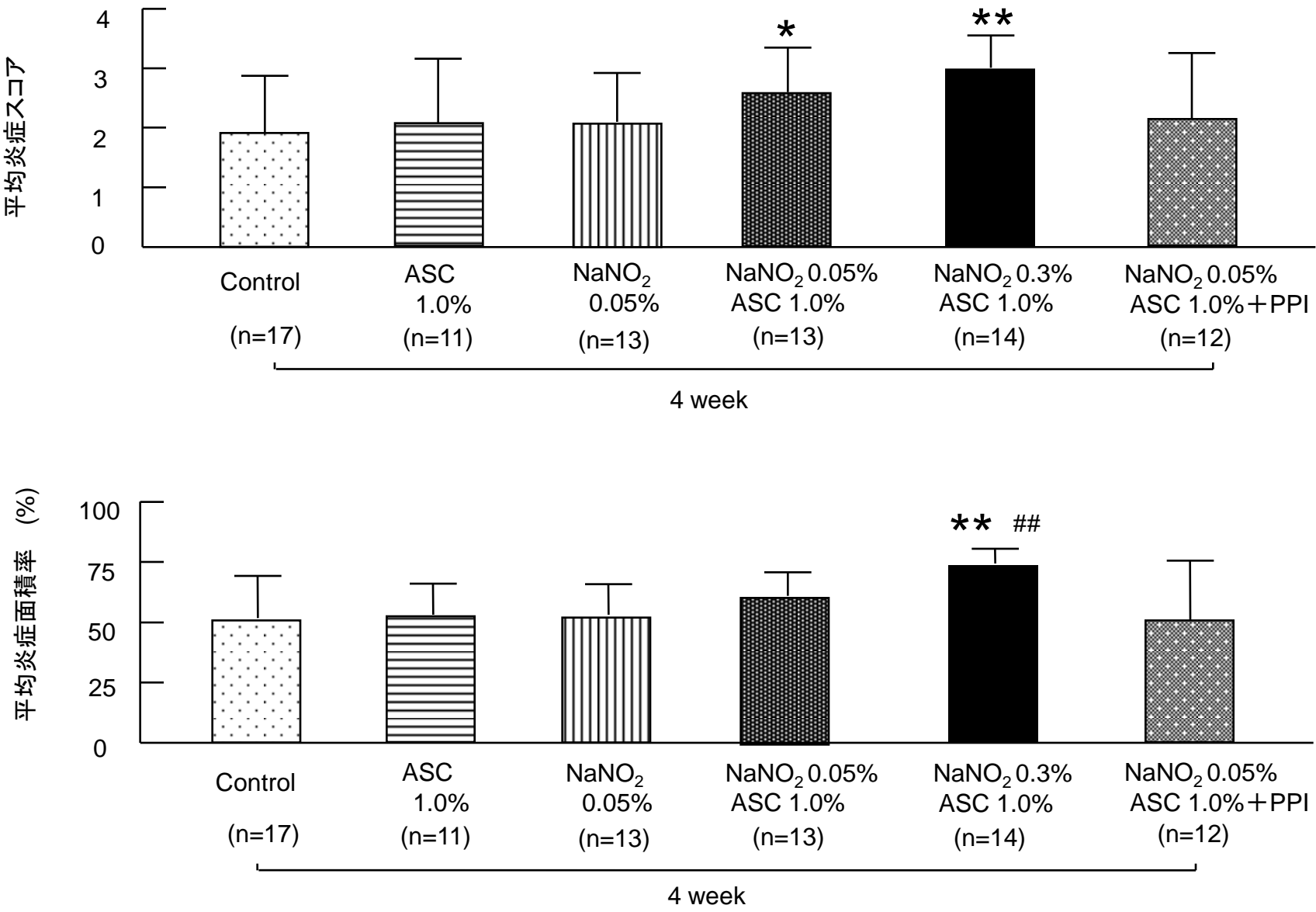


Figure 7

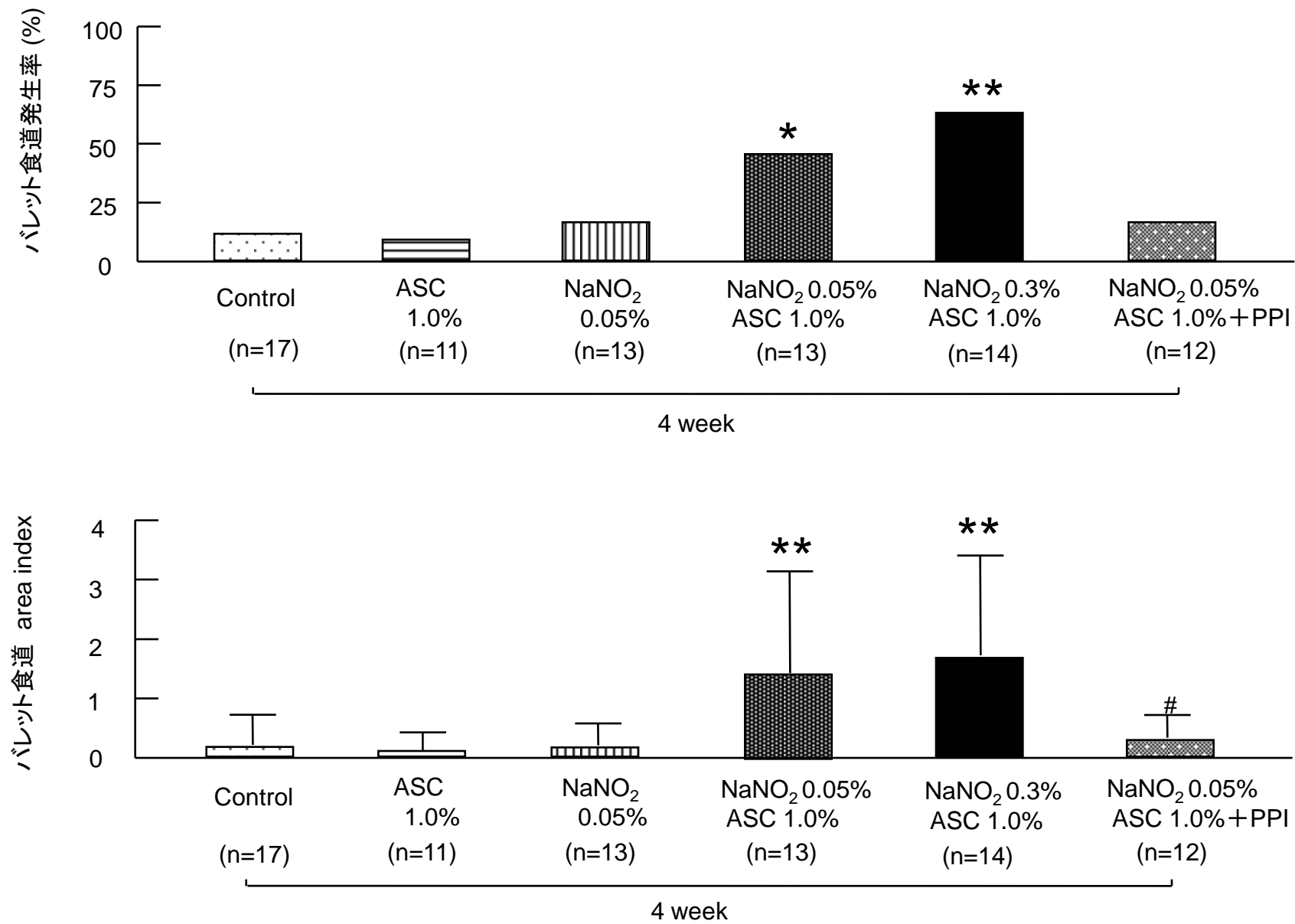


Table 1. 各群における体重変化(実験1)

Group		体重 (g)	
		実験開始時	実験終了時
2W			
Control	(n=15)	218±25	206±32
NO	(n=15)	210±12	202±36
4W			
Control	(n=20)	206±38	256±47
NO	(n=20)	209±15	240±29
8W			
Control	(n=16)	206±13	266±44
NO	(n=16)	208±17	247±45